

# 研究報告書

## 「超高効率でイソプレノイド燃料をつくる藻類の創製」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 梅野 太輔

### 1. 研究のねらい

テルペノイドは知られるだけで 55,000 を超える一大天然物群である。その中には、医薬、化成品、そしてディーゼル／ジェット燃料などとして価値ある化合物が数多く含まれている。注目すべきは、これだけ多様な分子骨格が、限られた共通の基質 ( $C_{5-25}$  ニリン酸) から、ひとつの酵素ファミリーによって1ステップで創られる点である。テルペノイドの燃料特性(セタン／オクタン価、凍結温度、蒸気圧など)は、その分子構造により大きく異なる。つまり、ひとたびテルペノイド燃料の効率的な生産システムを完成すれば、どんな内燃機関にも最適な燃料分子をオンデマンドに供給できる。また、最下流の合成酵素を取り替えるだけで、同一の経路を香料・医薬品、合成・天然ゴム原料など、多くのファインケミカルを合成できる。これをシアノバクテリアで効率的に働かせることができれば、これら燃料テルペノイドを二酸化炭素と太陽から超高効率に合成することができる。

テルペンの経路の代謝工学は、大腸菌や酵母を宿主とした前駆体経路の強化が飛躍的に進んだが、肝心のテルペン酵素の活性がボトルネックとなり、その生産効率は長らく頭打ちしている。また藻類での同様の試みは、もともとの中心代謝の力価の不足に加え、カロテノイドやフィトールなど、テルペン生産に競合する複数の経路が存在する。本研究では、まずはテルペン酵素の活性そのものを高めることによって、テルペンの微生物生産を打破することを目指した。また、作出したテルペン酵素をシアノバクテリア内でしっかり発現させるための遺伝子誘導系のデザインと実装も目指した。いずれもその本質はタンパク質からなる複数のパーツの機能改良である。本研究では、それぞれに適した「進化分子工学」の手法の開発から着手することにした。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

テルペンは無色透明であり、しかも殆どは揮発性を持つため、その生成をハイスループットに計測することは困難である。一方で、テルペン合成の前駆体(プレニルニリン酸)は天然色素カロテノイドの前駆体でもある。このことを利用して、あらゆるテルペン酵素の細胞活性を、基質消費機能の間接的な読み出しとしてスコア化する手法を開発した(研究テーマ A)。これをスクリーニング原理として利用し、燃料テルペンとして注目される、ビスボレン、ファルネセン、ゲラニオール、ピネン、スクアレンの合成酵素の進化工学を試みた。その結果、ビスボレンやピネン酵素の高活性変異体を複数得ることに世界で初めて成功した(研究テーマ B)。

本研究を通して我々は、幾つかの「想定外」を経験した。ひとつは、本手法で作出した高活性型のゲラニオール合成酵素変異体の大腸菌での過剰発現は致死であることを見いだした

ことである。この致死性は前駆体供給経路を増強することによって回避できることが分かった。この現象を利用することによって我々は、期せずしてテルペンの前駆体供給経路の酵素の活性スクリーニング手法を確立することができた(研究テーマ C)。また、スクアレン合成酵素の細胞活性向上を目指して、上述の基質消費能をスクリーニングの過程で、ブドウ球菌由来のカロテノイド不飽和化酵素(CrtN)がスクアレンを直鎖基質として色素をつくることを偶然発見した。この発見を皮切りに、燃料物質スクアレンとカロテノイド色素の代謝経路がどのように分岐し得たかについて貴重な情報を得ることができた(研究テーマ D)。また、さまざまな分子量のスクアレン化合物を細胞で効率的に合成することに成功した。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A 「基質消費能をもとにしたテルペン酵素活性のスクリーニング手法」

酵素の活性向上には、進化工学的なアプローチが最も適切である。進化工学は、遺伝子レベルでのランダム変異の導入(ライブラリ化)と、それに続く機能選抜によって成立するが、スクリーニング手法の不在から、テルペン酵素の進化工学の実施は困難であった。

本プロジェクトでは、テルペン酵素の原料がカロテノイド色素の生合成経路と共通であることに着目した(下図)。すなわち、テルペン酵素をカロテノイド合成酵素と一つの細胞で共に発現させれば、両者が共通の原料(イソプレニル二リン酸)を取り合うことになる。

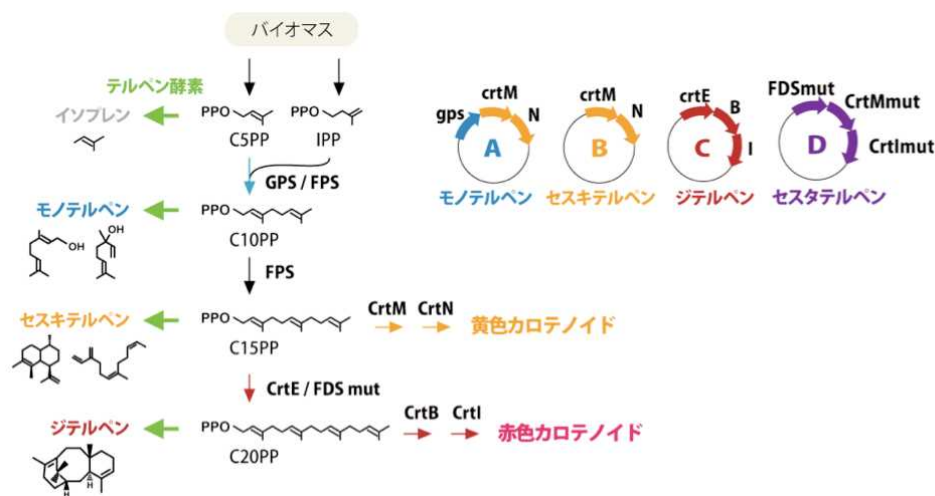


図 テルペン酵素の細胞内活性を指標に色識別するフォーマット

この状況では、より優れた細胞活性を示すテルペン酵素変異体は、その色素蓄積量が相対的に減る:そしてそれは寒天培地上のコロニーの色の变化として視認できるわけである。本原理に基づき、大腸菌内でテルペン酵素の活性をハイスループットにスクリーニングすることができる手法を確立した(文献 1)。本系のユニークなところは、それが基質消費能をスコア化する点にある:生産物の種類に関わらず、テルペン合成酵素ならばあらゆる酵素に適用可能である。また、スクリーニングプラスミドを巧妙にデザインすることによって、モノテルペンとセスキテルペン、そしてジテルペン活性を見分けることが可能であるため、テルペン酵素の基質・反応物特異性の改変などを可能とする。テルペン酵素の基礎的研究に広く貢献するものと期待される。

#### 研究テーマ B 「テルペン酵素の活性進化と微生物生産への応用」

燃料テルペンとして特に有望視されているものとして、セタン価の高く曇点の低いビサボレンやファルネセンが挙げられる。上節の手法を用いて、これらの合成酵素の進化工学を行った。いずれも遺伝子のランダム化→機能選抜の手順によって、首尾よく種々の活性の改良された変異体を得た。その中には、発現ミュータント(酵素の性能は変わらないが副次的に翻訳効率があがったもの)も多く含まれていたが、酵素そのものの細胞活性を向上させる変異も数多く得ることができた。これらを組み合わせ、さらに性能の高い変異体を得ることに成功した。上記手法をうまく利用することによって、ゲラニオールやピネンなど、より低沸点のモノテルペン群の合成酵素の活性改良にも成功した。

こうして得たテルペン酵素変異体を、前駆体を強化するメバロン酸経路とともに大腸菌に導入したところ、フラスコ培地で 250-900 mg/L という高い生産性を達成することができた。

#### 研究テーマ C 「基質枯渇の回避による上流経路の増強因子の選抜手法」

上で作出した高活性型のゲラニオール合成酵素変異体(M53)の性能調査の際、我々は、大腸菌内で単独で過剰発現は致死であることを偶然見いだした。最初はゲラニオールそのものの細胞毒性であると考えられたが、この致死性は、前駆体供給経路を増強する遺伝因子(ispA や idi など)の追加発現によって回避できることが明らかとなった。この現象をうまく利用することによって、安定して 10,000 倍以上の濃縮率を誇る画期的なテルペンの前駆体供給経路の酵素の活性選抜手法を確立することができた(特許1)。これはテルペン酵素のさらに上流の律速酵素の同定およびその活性改良の進化工学研究を、液体培地をつかった生死選抜によって行うことを可能とするものと期待される。

#### 研究テーマ D 「スクアレン酵素の特異性変換」

スクアレンは潤滑剤や化粧品原料として広く需要があるのみならず、最近ではボトリオコッセンと並んで、藻類に由来する代表的炭化水素として注目されている。スクアレンはファルネシルニリン酸を二分子縮合してつくられるので、ビサボレンをはじめとするセスキテルペンのすくリーニングシステムによって活性改良できると考え、ブドウ球菌のカロテノイド経路との「競合」状態を大腸菌内に再現した。しかしこの酵素に限って、多く活性の高い(より白いコロニーを与える)変異体は全く得られなかった。最終的に我々は、カロテノイドの不飽和化酵素(CrtN)がスクアレンを直接基質として色素に転化していることを発見した(文献2)。

この発見によって、スクアレンの合成酵素活性は、生産物ベースで直接可視化できるようになった。これを利用して私たちは、スクアレンとフィトエンの創り分けがどのように実現しているかを明らかにすることができた(文献3)。また、その知見を利用して、非天然骨格をもつ(C35, C40, C45, C50 など)種々のスクアレンの生合成経路を確立することに成功した。また、メバロンサン経路などの前駆体経路を追加導入することによって、乾燥菌体の 230ppm までスクアレン類を蓄積させることに成功した。

#### 研究テーマ E「シアノバクテリアへの実装のための遺伝子誘導系のシリーズ作成」

シアノバクテリアは藻類の中でも染色体工学技術が特に進んでおり、信頼できる発現系も複数報告がある。しかしそれでも、大腸菌に比べると、その代謝工学ツールはきわめてラインナップも性能も不充実である。特に外来遺伝子の発現レベルは、既知・未知の様々な制御ネットワークのもと、多くの場合、非常に低いレベルにとどまっている。

そこで本プロジェクトでは、大腸菌ファージ T7 系を基盤とした種々の遺伝子スイッチおよび回路を作成し、「大腸菌でつくって」「シアノバクテリアで動作確認する」歩留まりのよいワークフローの開発を試みた。ヌクレオシドキナーゼとカナマイシン耐性遺伝子を組み合わせた遺伝子発現系の進化デザインシステムを開発し(文献5)、数多くの T7 ベースのスイッチを何百も取り揃えることができた。これらは理論上、シアノバクテリアで働く「はず」の構成としている。これらの性能をシアノバクテリア内での組織的な評価・選別を行うことにより、シアノバクテリアの tried-and-true な代謝工学ツールを提供できるものと期待される。

### 3. 今後の展開

#### (1) シアノバクテリアへの実装とテルペン生産

本プロジェクトでは、燃料特性の異なるさまざまなテルペン炭化水素のより高活性な変異体を得ることができた。これらの「秀逸性」は大腸菌内では実証されている。本プロジェクトの最終段階として、シアノバクテリアに導入したとき、野生型の酵素に比べてどれほど細胞生産の向上につながるかに興味を持たれる。CO<sub>2</sub> から有価・燃料テルペンへの効率よい変換を目指してこれからも本プロジェクトを継続したいと考える。

#### (2) 前駆体供給経路の酵素も活性改良の対象に

テルペン合成酵素の活性改良の必要は広く認識されているが、じつは、メバロン酸経路・非メバロン酸経路に関わらず、微生物のイソプレノイド前駆体の供給経路のキャパシティ(と伸びしろ)についての情報はきわめて乏しい。一般に増殖の遅い藻類は、それぞれの酵素の触媒活性も低いと想像される。本プロジェクトで偶然得た「基質枯渇とその回避による上流経路のスクリーニングシステム」(研究テーマ C:特許1)を使うことにより、藻類のイソプレノイド経路をなす酵素ひとつひとつの強化を行うことが可能となった。全体として代謝流量の高くない藻類において、これらの酵素の活性改良は、それが僅かなものであってもイソプレノイド経路への「引き込み」を強く促進するものと期待される。

#### 4. 評価

##### (1) 自己評価

###### (研究者)

- ・ 本プロジェクトの当初の目的は、(1)テルペン酵素の強化 → (2) シアノバクテリアでの発現 → (3) テルペン生産効率の最高記録を樹立、という非常に単純明快なものであった。(1)は予定以上の達成、(2)(3)は道半ば、という自己評価である。
- ・ 本研究を通じて、申請者がなじみ親しんでいるカロテノイドの合成経路と、スクアレン合成経路(トリテルペン)の意外な関係が明らかになった。これをもとに、想定になかった新たなテーマが生まれたことは僥倖であった。今後5年にわたって研究室が総力で取り組むべきあらたなテーマに繋がったことは、研究者本人にとって、本さがけプロジェクトにおける最大のものであったと感じている。
- ・ 藻類に限らず、テルペンの微生物生産は世界中の研究室・企業が参画する競争の激しい分野である。どちらかというと細胞工学主体で発展してきた本分野において、テルペン酵素そのものの機能向上をルーチンで行う機会を提供する本研究は、テルペン類の効率生産に大きく貢献するものと期待される。実際に、複数の国内との共同研究が始まっており、そして海外の企業・研究組織との協議が始まっている。

##### (2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)

###### (研究総括)

本さがけ研究の成果が世界に認知され、国際学会の招待講演や多くの企業研究者など複数の共同研究に発展している。本研究において、カロテノイドの合成経路と、スクアレン合成経路(トリテルペン)の関連を明らかにするなど、さがけ研究終了後に繋がる新しい研究の方向を見いだしたようであり、今後の進展に期待が持てる。しかしながら、本研究で作り出した変異体の数々を、シアノバクテリアに導入し、機能解析を行う段階であり、当初の提案目標の実現に向け、継続した研究が望まれる。



## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. M. Furubayashi, M. Ikezumi, J. Kajiwar, M. Iwasaki, A. Fujii, L. Li, K. Saito, and D. Umeno: A high-throughput colorimetric screening assay for terpene synthase activity based on substrate consumption. PLoS ONE, 9(3): e93317 (2014).
2. M. Furubayashi, L. Li, A. Katabami, K. Saito, D. Umeno: Construction of carotenoid biosynthetic pathways using squalene synthase. FEBS Letters, 588, 436–442 (2014).
3. M. Furubayashi, L. Ling, A. Katabami, K. Saito, D. Umeno: Directed evolution of squalene synthase for dehydrosqualene biosynthesis. FEBS Letters, 588, 3375–3381 (2014).
4. A. Katabami, L. Ling, M. Iwasaki, M. Furubayashi, K. Saito, and D. Umeno: Production of squalene by squalene synthases and their truncated mutants in Escherichia coli: J. Bioscience Bioengin., 119, 165–171 (2015).
5. M. Tominaga, K. Ike, S. Kawai-Noma, K. Saito, D. Umeno: Rapid and liquid-based selection of genetic switches using nucleoside kinase fused with aminoglycoside phosphotransferase, PLOS One, in press.

### (2) 特許出願

研究期間累積件数: 1 件

1.

発 明 者: 梅野太輔 岩寄美希

発明の名称: テルペン合成酵素をコードする遺伝子のスクリーニング方法

出 願 人: 千葉大学

出 願 日: 2013/5/16

出 願 番 号: 特願 2013-104412

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. Development of the evolutionary design platform for genetic switches and circuits. Cold Spring Harbor Symposium ,Synthetic Biology (2012/11/29, 広州)
2. A Highly Specific synthetic metabolic pathways assembled from promiscuous enzymes. SB6.0 (2013/7/9–11, London)
3. Selection tools for the evolutionary engineering of genetic networks and genomic DNA. 1<sup>st</sup> SEED Meeting, (2014/7/14–17, Los Angeles).

ほか 招待講演 国内 11 件 国際 8 件